

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox. ✓**

THIS PAGE BLANK (uspto)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Didier LEFEVRE et al.

Serial No.: To be assigned

Filed: Herewith

For: REAGENT AND PROCESS FOR THE
IDENTIFICATION AND COUNTING OF
BIOLOGICAL CELLS

Art Unit: To be assigned

Examiner: To be assigned

Atty Docket: 20198/0059

1c971 U.S. PTO
10/081118
02/25/02

**SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT(S) and
CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119**

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

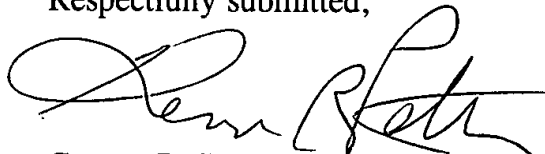
Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), certified copies of which are enclosed. The documents were filed in a foreign country within the proper statutory period prior to the filing of the above-referenced United States patent application.

<u>Priority Document Serial No.</u>	<u>Country</u>	<u>Filing Date</u>
<u>0102489</u>	<u>France</u>	<u>February 23, 2001</u>

Acknowledgement of this claim and submission in the next official communication is respectfully requested.

Respectfully submitted,



George R. Pettit, Reg. No. 27,369
Connolly Bove Lodge & Hutz LLP
1990 M Street, N.W.
Washington, D.C. 20036-3425
Telephone: 202-331-7111

Date: 2/25/02

THIS PAGE BLANK (USPTO)



1c971 U.S. PTO

10/081118



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

21 JAN. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

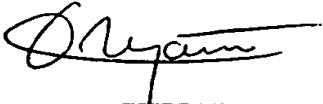

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES DATE 23 FEV 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0102489 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 23 FEV. 2001 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE <p style="text-align: center;">CABINET NETTER 40 rue Vignon 75009 PARIS</p>	
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> ABX Aff 10 (120545)			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) <p style="text-align: center;">Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques.</p>			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Adresse Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» <p style="text-align: center;">ABX</p> <p style="text-align: center;">Société Anonyme</p> <p style="text-align: center;">Parc Buromédecine - Rue du Caducée - BP 7290 34184 MONTPELLIER Cedex 4 France française</p>	

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 23 FEV 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0102489		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 190600
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		abx aff. 10 (120545)	
6 MANDATAIRE Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		BEZAULT Jean Cabinet NETTER 40 rue Vignon 75009 PARIS 01 47 42 02 23 01 47 42 60 02	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
N° Conseil 92-1024 (B) (M) Jean BEZAULT 			

ABX10.FRD

5 Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de
cellules biologiques

L'invention se rapporte aux analyses biologiques et notamment aux analyses de sang.

10 Elle concerne plus particulièrement un réactif et un procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang.

15 L'échantillon biologique peut être du sang humain ou animal, ou encore tout autre liquide biologique ou préparation biologique.

Dans le domaine des analyses biologiques, l'importance du diagnostic de la détermination et du comptage précis de
20 différentes populations cellulaires est reconnue depuis longtemps. En effet, l'apparition de rapports d'équilibre anormaux entre populations cellulaires normales du sang peut être corrélée à l'apparition de certaines maladies, par exemple réactions immunitaires, inflammatoires, etc. De même,
25 l'apparition de populations cellulaires anormales peut également être corrélée à l'apparition d'autres maladies, telles que des leucémies, etc.

Les méthodes traditionnelles d'analyse cytologique peuvent être
30 variées et comprennent l'observation microscopique après coloration, et éventuellement sédimentation ou agrégation. La détermination automatique des cellules sanguines a commencé dans le début des années 1960 par la séparation des principales populations leucocytaires normales ; voir la référence
35 bibliographique suivant : (1) Hallerman L., Thom R., Gerhartz H. : "Elektronische Differentialzählung von Granulocyten und Lymphocyten nach intervaler Fluochromierung mit Acridinorange."

5 Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de
cellules biologiques

L'invention se rapporte aux analyses biologiques et notamment aux analyses de sang.

10 Elle concerne plus particulièrement un réactif et un procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang.

15 L'échantillon biologique peut être du sang humain ou animal, ou encore tout autre liquide biologique ou préparation biologique.

20 Dans le domaine des analyses biologiques, l'importance du diagnostic de la détermination et du comptage précis de différentes populations cellulaires est reconnue depuis longtemps. En effet, l'apparition de rapports d'équilibre anormaux entre populations cellulaires normales du sang peut être corrélée à l'apparition de certaines maladies, par exemple réactions immunitaires, inflammatoires, etc. De même,
25 l'apparition de populations cellulaires anormales peut également être corrélée à l'apparition d'autres maladies, telles que des leucémies, etc.

30 Les méthodes traditionnelles d'analyse cytologique peuvent être variées et comprennent l'observation microscopique après coloration, et éventuellement sédimentation ou agrégation. La détermination automatique des cellules sanguines a commencé dans le début des années 1960 par la séparation des principales populations leucocytaires normales ; voir la référence
35 bibliographique suivante : (1) Hallerman L., Thom R., Gerhartz H. : "Elektronische Differentialzählung von Granulocyten und Lymphocyten nach intervaler Fluochromierung mit Acridinorange."

Verh Deutsch Ges Inn Med 70 : 217, 1964.

La séparation des leucocytes a été réalisée en cytométrie de flux par l'utilisation de multiples principes impliquant les propriétés optiques et chimiques des cellules. Plusieurs automates d'hématologie ont été fabriqués, utilisant des techniques variées, comme le principe de Coulter pour la détermination des volumes, la mesure de lumière diffractée pour l'estimation des tailles, la mesure de lumière diffusée à 90° pour la détermination des structures internes des cellules, et les mesures de fluorescence ou d'absorption pour la détermination des affinités cellulaires à divers colorants ; voir les références bibliographiques 2 à 5 suivantes :

- (2) Adams L.R., Kamensky L.A. : "Fluorometric Characterization of Six Classes of Human Leukocytes." Acta Cytol 18 : 389, 1974 ;
(3) Shapiro H.M. et al. "Combined Blood Cell Counting and Classification with Fluorochrome Stains and Flow Instrumentation" J. Histochem Cytochem 24 : 396-411, 1976 ;
(4) Terstappen L.W. et al. "Multidimensional Flow Cytometric Blood Cell Differentiation Without Erythrocyte Lysis." Blood Cells 17: 585-602, 1991 ;
(5) Terstappen L.W., Levin J. "Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry" Blood Cells 18 (2) : 311-30, 1992.

La caractérisation de cellules à des stades précoces du cycle cellulaire a depuis longtemps intéressé les scientifiques et la quantification du contenu de chaque cellule en ARN est reconnue de longue date comme étant un paramètre représentatif de ce cycle ; voir les références bibliographiques 2 à 5 ci-dessus et les références bibliographiques 6 et 7 suivantes :

- (6) Traganos F., Darzynkiewicz Z., Sharpless T., Melamed M.R. "Simultaneous Staining of Ribonucleic and Deoxyribonucleic Acids in Unfixed Cells Using Acridine Orange in a Flow Cytofluorometric System" J. Histochem Cytochem 25 : 46, 1977 ;
(7) Pollack A. et al. "Flow Cytometric Analysis of RNA Content

in Different Cell Populations Using Pyronin Y and Methyl Green" Cytometry, vol. 3, n° 1, pages 28-35, 1982.

5 Dans son brevet français n° 97 01090, du 31 janvier 1997, la demanderesse a décrit déjà une composition, et plus particulièrement un réactif de coloration, permettant ce type d'analyse.

10 Pour automatiser de telles techniques, il est nécessaire de résoudre préalablement de multiples problèmes comme, notamment, la réduction des temps et du coût de traitement des échantillons. Cette réduction peut être abordée de différentes manières, la plus évidente étant la réduction du nombre de canaux pour n'effectuer qu'une seule préparation cellulaire à la fois. Ce type de technique a préalablement été décrit par 15 Léon W. Terstappen (référence 4 ci-dessus), mais nécessite un temps de traitement et d'analyse important, notamment pour le comptage précis des cellules nucléées dont la quantité est couramment mille fois plus faible que les cellules 20 érythrocytaires.

Couramment, pour pallier cela, l'échantillon biologique est fréquemment séparé en au moins deux aliquotes, dont l'une est préparée à une certaine concentration permettant l'étude des 25 cellules érythrocytaires et des plaquettes, et dont l'autre est préparée à une concentration plus forte pour l'analyse des cellules nucléées.

Ces techniques connues présentent différents inconvénients.

30 Préalablement à l'analyse, le traitement de cette aliquote comprend fréquemment la destruction spécifique des cellules érythrocytaires pour faciliter la mesure des cellules restantes. Une telle méthode permet d'obtenir plus rapidement 35 les résultats des observations, mais est néanmoins freinée par les temps de réaction, de transfert et de coloration pour

obtenir la préparation souhaitée.

Le temps d'incubation d'une suspension cellulaire dans une solution réactive est notamment lié au temps nécessaire aux principes actifs pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Dans le brevet français 9701090 déjà cité, la demanderesse a décrit des moyens pour accélérer cette pénétration grâce à l'utilisation d'un additif, notamment d'un additif du type ionophore, pour aider à la pénétration cellulaire.

10

Le temps de traitement est également fonction du nombre d'étapes successives que devra subir l'aliquote. La lyse et la coloration des cellules sont couramment réalisées en deux étapes successives, dans un ordre ou dans l'autre (voir le brevet US 6 004 816).

15

Ces deux étapes de dilution impliquent un coût non négligeable en matériel, associé à un temps de traitement minimal important.

20

C'est en conséquence un but de l'invention de proposer un réactif pour l'identification et le comptage de cellules biologiques qui surmonte les inconvénients précités.

25

C'est en particulier un but de l'invention de procurer un tel réactif qui permet d'effectuer simultanément la lyse de certaines cellules, en particulier de cellules érythrocytaires, la fixation des cellules nucléées et la coloration du matériel intracellulaire.

30

C'est également un but de l'invention de procurer un tel réactif qui permet de réaliser ces opérations dans un temps restreint pour réduire de façon importante les coûts et les temps d'analyse, et le nombre de réactifs.

35

L'invention propose à cet effet un réactif pour

l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, lequel comprend :

- 5 - un agent de lyse cellulaire choisi parmi au moins un détergent en une concentration efficace pour lyser spécifiquement un type donné de cellules de l'échantillon, et
- un colorant propre à marquer les acides nucléiques intracellulaires des cellules restantes non lysées.

10

L'invention procure ainsi un réactif de lyse et de coloration simultanée d'un échantillon biologique, permettant d'obtenir en une seule étape une solution de cellules pouvant être analysée, par exemple par un système de cytométrie en flux. Cette analyse
15 permet d'obtenir une classification et un comptage des cellules ainsi traitées.

Ainsi, le réactif de l'invention combine une solution réactive du type décrit dans le brevet français 97 01090 avec un agent
20 de lyse cellulaire qui permet de lyser spécifiquement un type donné de cellules de l'échantillon, en particulier les cellules érythrocytaires.

La solution réactive colorante en elle-même, décrite dans le
25 brevet français 97 01090, permet d'accélérer la perméation membranaire pour la coloration des cellules biologiques de l'échantillon. Cette solution colorante peut être utilisée aussi bien avant qu'après la lyse des hématies selon les types cellulaires à étudier. Ainsi, le principe réactif de cette
30 solution colorante a été conservé et transposé au sein d'une solution lytique permettant une destruction des hématies et une coloration des cellules restantes préalablement à la mesure.

L'agent de lyse cellulaire comprend avantageusement au moins un
35 détergent ionique et/ou non ionique dans une concentration propre à lyser les érythrocytes.

Le détergent de l'invention est avantageusement choisi parmi :

- 5 - les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines, les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;
- les amides de diamines substituées, la diéthanolamino-
10 propylamine ou le diéthylamino-propylamide, les amides de diéthylènetriamine cyclisés,
- les alkylaryl sulfonates, sulfonates de pétrole, glycérides sulfonés ;
- 15 - les cholamides, les sulfobétaïnes ;
- les alkyl glycosides, les saponines ;
- 20 - les polyoxyéthylène éthers et sorbitans, et les polyglycol éthers.

Dans un exemple de réalisation, ce détergent comprend un mélange de Triton X100 à une concentration de 0,05% (p/v) et de
25 Tween 20 à une concentration de 0,0001% (v/v).

Dans toute la description, l'expression "p/v" signifie "poids/volume" et l'expression "v/v" signifie "volume/volume".

30 Le colorant utilisé est avantageusement du type fluorescent.

Avantageusement, on choisit un colorant qui est propre à s'associer spécifiquement à l'acide ribonucléique intracellulaire et à augmenter sa fluorescence, une fois
35 associé à celui-ci.

Le colorant de l'invention peut être choisi notamment parmi la les colorants suivants :

- 5 - le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate,
- le thiazole blue,
- 10 - le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonium)propyl], diodure,
- le 3,3'-diméthylloxacarbocyanine iodure ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2-(3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure,
- 15 - la thioflavine T,
- les colorants SYTO® et TOTO® (TM Molecular Probes),
- 20 - le bromure d'éthidium,
- l'iodure de propidium,
- 25 - l'acridine orange,
- la coriphosphine O,
- l'auramine O,
- 30 - les colorants HOECHST 33258 et HOECHST 33342,
- le 4',6-diamino-2-phénylindole, dihydrichlorure (DAPI),
- 35 - le 4',6-(diimidazolin-2-yl)-2-phénylindole, dihydrochlorure (DIPI),

- la 7 aminoactinomycine D,
- l'actinomycine D, et
- le LDS 751.

5

Dans une forme de réalisation préférée de l'invention, le réactif comprend en outre au moins un agent de pénétration
10 membranaire propre à favoriser la pénétration du colorant dans les cellules à marquer.

L'agent favorisant la pénétration membranaire est
15 avantageusement un composé ionophore de type protonophore et/ou antibiotique.

Cet agent est généralement présent à une concentration inférieure à 0,005% (p/v). Un exemple d'antibiotique utilisable
est la valinomycine.

20

Il est avantageux que le réactif comprenne, en outre, au moins un agent de fixation membranaire présent à une concentration de 0,1% à 10% (p/v). Cet agent de fixation comprend, de préférence, au moins un alcool et/ou un aldéhyde. A ce titre,
25 on préfère utiliser, par exemple, le paraformaldéhyde ou le glutaraldéhyde.

Il entre également dans le cadre de l'invention de prévoir d'autres additifs ou composants dans le réactif.

30

Ainsi, ce réactif peut comprendre, en outre, au moins un composé choisi parmi un agent complexant, un sel inorganique et un système tampon.

35 Sous un autre aspect, l'invention concerne un procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un

échantillon, en particulier dans un échantillon de sang, lequel comprend les opérations suivantes :

- 5 - mélanger et incuber l'échantillon avec un réactif tel que défini ci-dessus pour réaliser, en une seule étape, la lyse de cellules d'un type donné, en particulier de cellules érythrocytaires, la coloration des acides nucléiques intracellulaires et la fixation des cellules nucléées ;
- 10 - mesurer la solution résultante en cytométrie de flux avec au moins deux paramètres de mesure choisis parmi le volume résistif, la diffraction lumineuse dans l'axe, la transmission lumineuse dans l'axe, la diffusion lumineuse orthogonale et la fluorescence ; et
- 15 - classifier et compter les cellules nucléées en populations, au moyens des paramètres mesurés.

20 Dans la mesure en cytométrie de flux, le paramètre de diffraction lumineuse dans l'axe est au moins un paramètre choisi parmi la diffraction aux petits angles et la diffraction aux grands angles.

25 Cette mesure peut être réalisée au moyen d'un cytomètre de flux possédant les paramètres conventionnels tels que la diffraction dans l'axe ou "FSC" (Forward Scatter), la diffusion orthogonale ou "SSC" (Side Scatter), la fluorescence soit orthogonale (FL1), soit dans l'axe, soit en épi-fluorescence, le tout polarisé ou dépolarisé, mais également des paramètres de mesure

30 additionnels tels que la mesure de lumière transmise ou la volumétrie résistive, telles que décrites dans le brevet français 89 14120 du 27 octobre 1989.

La résistivité peut être mesurée au moyen d'un courant continu

35 (DC) afin d'exprimer le volume des éléments et/ou au moyen d'un courant pulsé ou alternatif (RF) afin d'exprimer les

différences densimétriques internes s'approchant de la détermination de la structure.

De ces paramètres, peuvent être extraits des ensembles
5 d'informations multiparamétriques pour chacune des cellules analysées, permettant leur classification. La classification sera d'autant plus précise que les paramètres définissant les cellules seront pertinents et nombreux. Ce type d'étude multiparamétrique a déjà été décrit précédemment (voir les
10 références bibliographiques 4 et 5 ci-dessus).

Dans le cadre de l'invention, les cellules nucléées classifiées
15 sont indifféremment des cellules matures ou immatures, normales ou anormales.

La classification des cellules nucléées est effectuée par des
procédés connus. Elle peut être réalisée par un logiciel
d'analyse multidimensionnel avec ou sans le recours à une
20 technique neuronale logicielle ou non.

Dans le cadre de l'invention, l'échantillon biologique peut
être un échantillon de sang humain ou animal, ou encore un
échantillon de liquide biologique ou une suspension de
25 cellules, d'origine humaine ou animale.

Cet échantillon est mélangé avec la solution réactive dans des
conditions de température définies. La cinétique de réaction
fait que les cellules érythrocytaires sont d'abord détruites,
30 la pénétration du colorant est aidée parallèlement à la fixation des cellules qui se fait plus lentement.

L'invention sera décrite maintenant en référence à l'exemple
suivant :

Exemple

Dans le cadre de cet exemple, on utilise un réactif ayant la composition suivante :

5

10	Agent complexant	EDTA	0,02 %	(p/v)
	Sel inorganique	NaCl	0,85 %	(p/v)
	Système tampon	Phosphates	0,5 %	(p/v)
	Détergents	Triton X100	0,05 %	(p/v)
		Tween 20	0,0001 %	(v/v)
	Ionophore	Valinomycine	0,003 %	(p/v)
	Colorant	Thiazole orange	0,005 %	(p/v)
	Aldéhyde	Paraformaldéhyde	1 %	(p/v)

15

Un échantillon de sang total est mélangé à la solution réactive ci-dessus. Après une incubation de quelques secondes (typiquement de l'ordre de 15 à 30 secondes), la solution est analysée au moyen d'un ensemble de cytométrie de flux comprenant au moins les paramètres suivants : diffraction dans l'axe (FSC) donnant une interprétation de la taille, diffusion orthogonale (SSC) exprimant la structure des éléments observés et fluorescence orthogonale (FL1) permettant de mesurer l'expression de l'acide ribonucléique intracellulaire.

25

Les résultats ainsi obtenus sont observés en mode multidimensionnel, afin de déterminer les inter-relations des différentes populations entre chaque paramètre.

30 On se réfère maintenant aux Figures 1 à 4 qui représentent les résultats obtenus avec un échantillon de sang humain normal.

La Figure 1 représente la matrice obtenue au moyen des deux paramètres de diffraction dans l'axe (FSC) et de diffusion

orthogonale (SSC). Quatre populations se détachent nettement : L figurant les lymphocytes, M figurant les monocytes, N figurant les polynucléaires neutrophiles et E figurant les polynucléaires éosinophiles. Les populations IG pour immature
5 granuleux, BL pour blastes, B pour polynucléaires basophiles et ErB pour érythroblastes sont indiquées mais non dissociables en seulement deux dimensions.

La Figure 2 représente la matrice formée par les paramètres de
10 diffraction dans l'axe (FSC) et de fluorescence (FL1). Les quatre mêmes populations que représenté à la Figure 1 se retrouvent, mais organisées différemment. Les cellules mononucléées L et M forment le groupe supérieur de fluorescence moyenne et les cellules polymorphonucléées N, E et B forment le
15 groupe inférieur de fluorescence faible. La population ErB des érythroblastes est nettement séparée à la pointe des deux groupes ainsi formés. Les emplacements normaux des populations BL et IG sont indiqués.

20 La Figure 3 représente la matrice formée par les paramètres de diffusion orthogonale (SSC) et de fluorescence (FL1). Les mêmes populations se retrouvent organisées d'une manière différente mais permettant d'isoler les populations IG et BL (en très petites quantités dans un échantillon normal).

25 La Figure 4 représente une vision tridimensionnelle des populations obtenues.

Les Figures 5 à 8 représentent les mêmes types de résultats que
30 les Figures 1 à 4 respectivement, mais obtenus avec un échantillon présentant des cellules blastiques (Bl) et traité conformément à l'invention.

Les Figures 9 à 12 représentent les mêmes types de résultats
35 que les Figures 1 à 4 respectivement, mais obtenus avec un échantillon présentant des cellules granulocytaires immatures

(IG) et traité conformément à l'invention.

Le réactif et le procédé de l'invention permettent ainsi, en une seule étape, de réaliser une lyse spécifique et une
5 coloration simultanée de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang humain ou animal.

On peut ainsi obtenir rapidement une identification et un
10 comptage de cellules à partir d'un automate d'analyse basé sur la cytométrie de flux.

Revendications

1. Réactif pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un agent de lyse cellulaire choisi parmi au moins un détergent en une concentration efficace pour lyser spécifiquement un type donné de cellules de l'échantillon, et
- un colorant propre à marquer les acides nucléiques intracellulaires des cellules restantes non lysées.

2. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent de lyse cellulaire comprend au moins un détergent ionique et/ou non ionique dans une concentration propre à lyser les érythrocytes.

3. Réactif selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi :

- les amines primaires, les acétates et chlorhydrates d'amines, les sels d'ammonium quaternaire et le bromure de triméthylcéthyl ammonium ;
- les amides de diamines substituées, la diéthanolamino-propylamine ou le diéthylamino-propylamide, les amides de diéthylènetriamine cyclisés,
- les alkylaryl sulfonates, sulfonates de pétrole, glycérides sulfonés ;
- les cholamides, les sulfobétaïnes ;
- les alkyl glycosides, les saponines ;

- les polyoxyéthylène éthers et sorbitans, et les polyglycol éthers.
- 4. Réactif selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé
5 en ce que le colorant est du type fluorescent.
- 5. Réactif selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé
en ce que le colorant est propre à s'associer spécifiquement à
l'acide ribonucléique intracellulaire et à augmenter sa
10 fluorescence, une fois associé à celui-ci.
- 6. Réactif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé
en ce que le colorant est choisi parmi :
 - 15 - le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-
benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate,
 - le thiazole blue,
 - 20 - le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-
benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-
(triméthylammonium)propyl], diodure,
 - le 3,3'-diméthylloxacarbocyanine iodure ou 3-méthyl-2-[3-
25 (3-méthyl-2-(3H)-benzoxazolylidène)-1-
propényl]benzoxazolium iodure,
 - la thioflavine T,
 - 30 - les colorants SYTO® et TOTO® (TM Molecular Probes),
 - le bromure d'éthidium,
 - l'iodure de propidium,
 - 35 - l'acridine orange,

- la coriphosphine O,
- l'auramine O,
- 5 - les colorants HOECHST 33258 et HOECHST 33342,
- le 4',6-diamino-2-phénylindole, dihydrichlorure (DAPI),
- le 4',6-(diimidazolin-2-yl)-2-phénylindole,
10 dihydrochlorure (DIPI),
- la 7 aminoactinomycine D,
- l'actinomycine D, et
- 15 - le LDS 751.

7. Réactif selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un agent de pénétration
20 membranaire propre à favoriser la pénétration du colorant dans les cellules à marquer.

8. Réactif selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'agent favorisant la pénétration membranaire est un composé
25 ionophore de type protonophore et/ou antibiotique.

9. Réactif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un agent de fixation membranaire présent à une concentration de 0,1% à 10% (p/v).

30 10. Réactif selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'agent de fixation membranaire comprend au moins un alcool et/ou un aldéhyde choisi parmi le paraformaldéhyde et le glutaraldéhyde.

35 11. Réactif selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé

en ce qu'il comprend en outre au moins un composé choisi parmi un agent complexant, un sel inorganique et un système tampon.

5 12. Procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques dans un échantillon, en particulier dans un échantillon de sang, caractérisé en ce qu'il comprend les opérations suivantes :

10 - mélanger et incuber l'échantillon avec un réactif selon l'une des revendications 1 à 11 pour réaliser, en une seule étape, la lyse de cellules d'un type donné, en particulier de cellules érythrocytaires, la coloration des acides nucléiques intracellulaires et la fixation des cellules nucléées ;

15 - mesurer la solution résultante en cytométrie de flux avec au moins deux paramètres de mesure choisis parmi le volume résistif, la diffraction lumineuse dans l'axe, la transmission lumineuse dans l'axe, la diffusion lumineuse orthogonale et la fluorescence ; et

20 - classifier et compter les cellules nucléées en populations, au moyens des paramètres mesurés.

25 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la mesure de résistivité est effectuée au moyen d'au moins un courant choisi parmi un courant continu (DC) et un courant pulsé ou alternatif (RF).

30 14. Procédé selon l'une des revendications 12 et 13, caractérisé en ce que le paramètre de diffraction lumineuse dans l'axe est au moins un paramètre choisi parmi la diffraction aux petits angles et la diffraction aux grands angles.

35 15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que les cellules nucléées classifiées sont

indifféremment des cellules matures ou immatures, normales ou anormales.

5 16. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que la classification des cellules nucléées est réalisée par un logiciel d'analyse multidimensionnel avec ou sans le recours à une technique neuronale logicielle ou non.

10 17. Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sang humain ou animal.

15 18. Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de liquide biologique ou une suspension de cellules, d'origine humaine ou animale.

FIG. 1

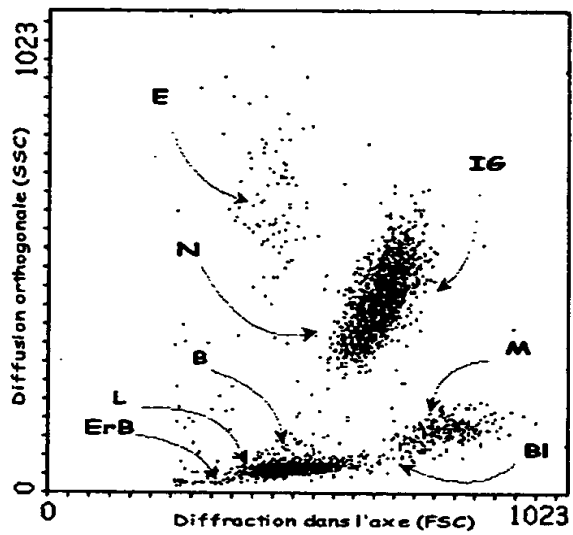


FIG. 2

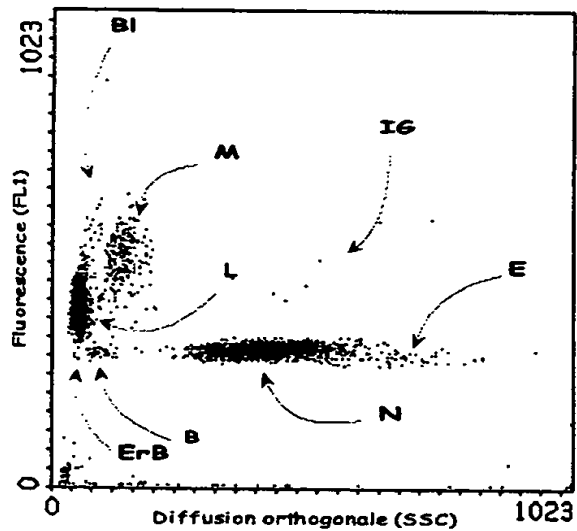
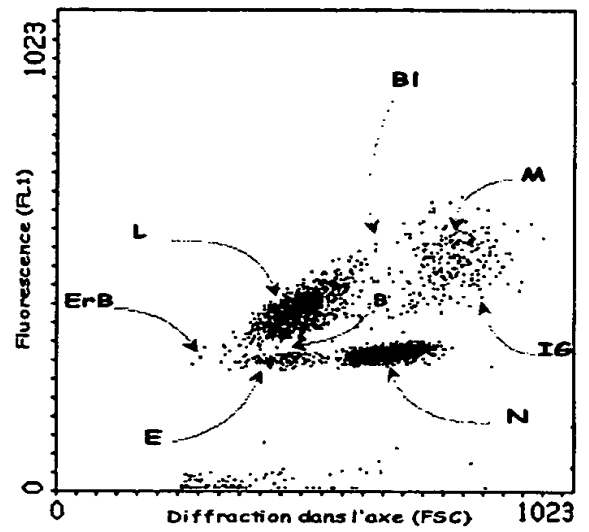


FIG. 3

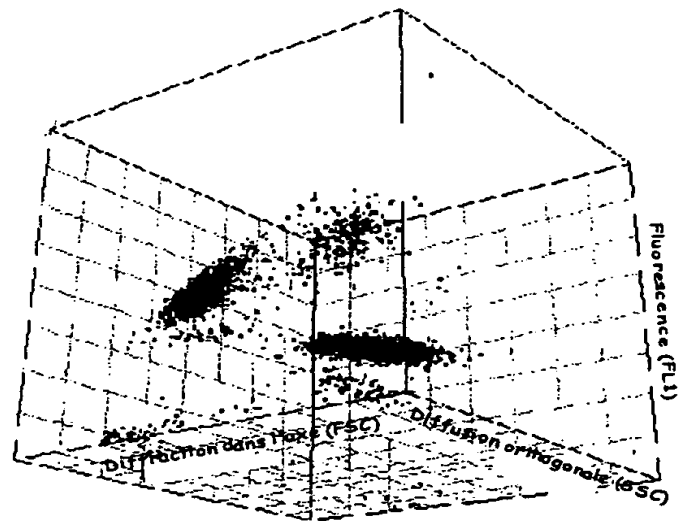


FIG. 4

FIG. 5

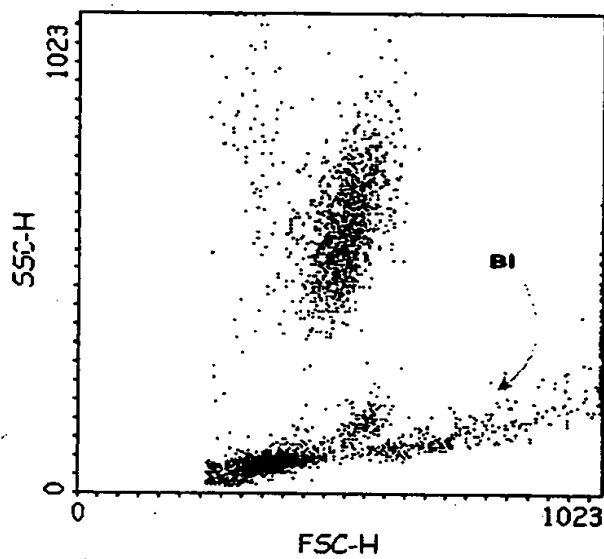


FIG. 6

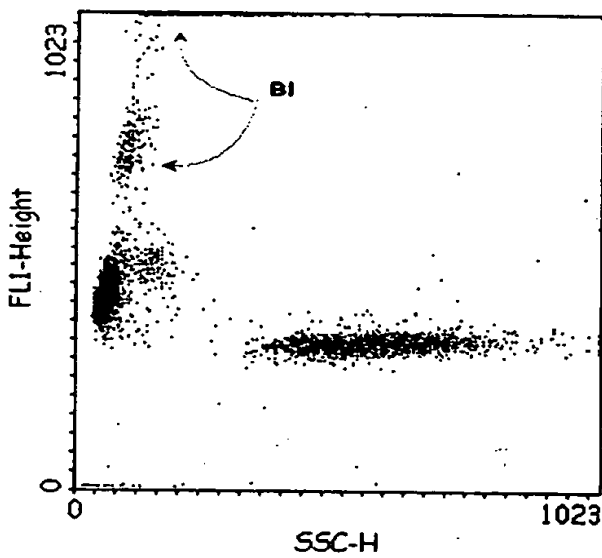
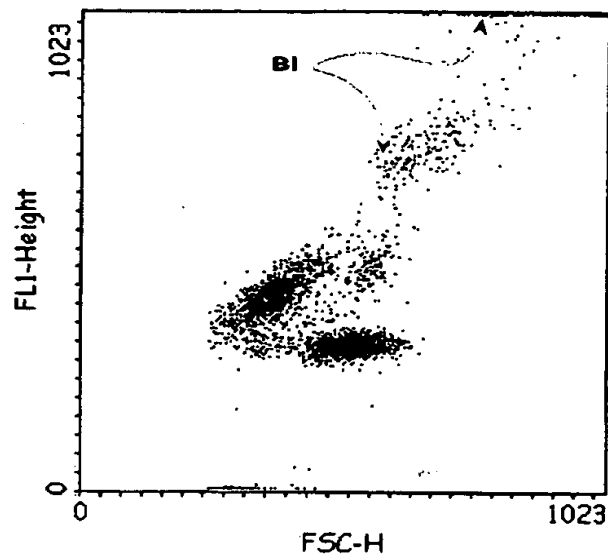


FIG. 7

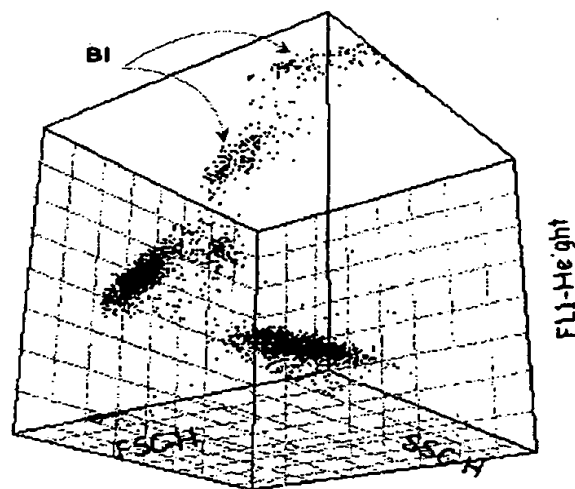


FIG. 8



FIG. 9

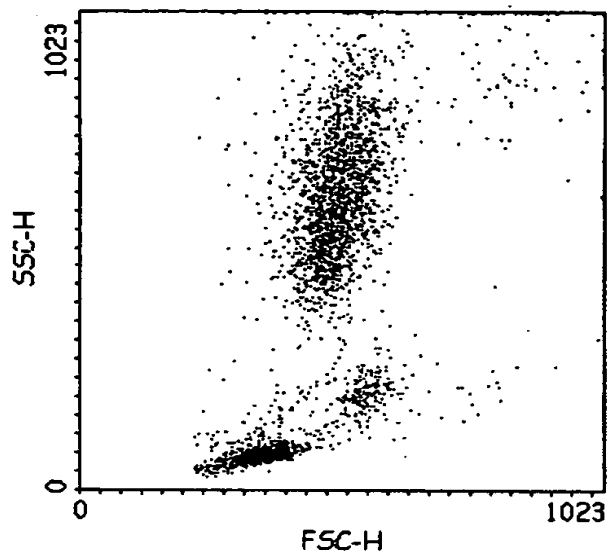


FIG. 10

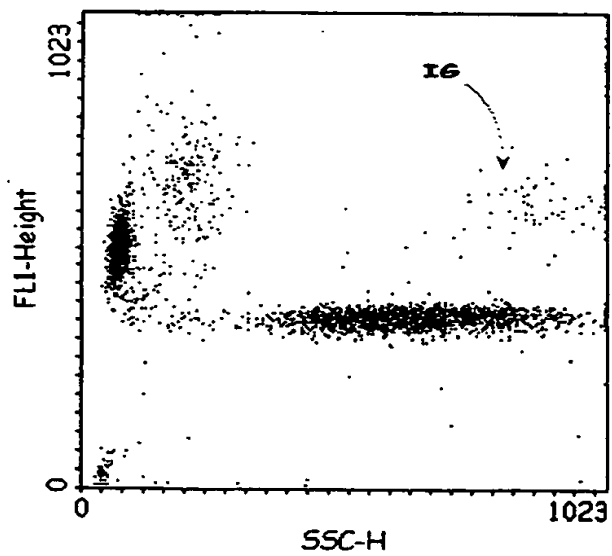
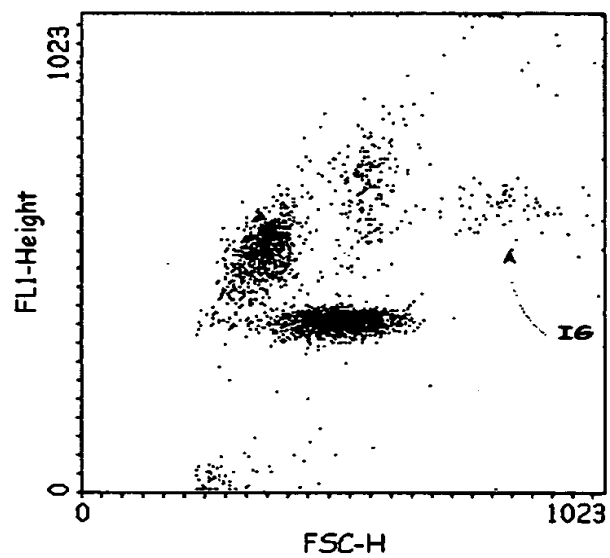


FIG. 11

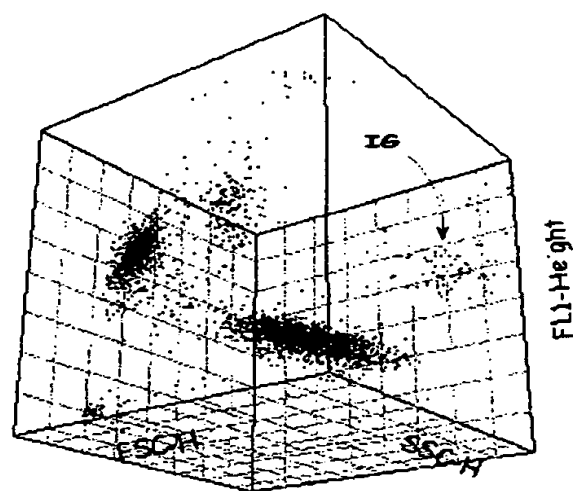


FIG. 12

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1. / .1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ABX Aff. 10 (120545)	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0102089	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Réactif et procédé pour l'identification et le comptage de cellules biologiques.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
ABX			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LEFEVRE	
Prénoms		Didier	
Adresse	Rue	160 rue du Mazet	
	Code postal et ville	34980	SAINT CLEMENT DE RIVIERE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VERIAC	
Prénoms		Sylvie	
Adresse	Rue	Les Jardins de l'Alhambra N° 7 511, rue Mr Teste	
	Code postal et ville	34000	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CHAMPSEIX	
Prénoms		Henri	
Adresse	Rue	2 chemin de Cambas Pioch de Baillos	
	Code postal et ville	34980	MONTFERRIER SUR LEZ
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 23 février 2001 N° Conseil 92-1024 (B) (M) Jean BEZAULT	

THIS PAGE BLANK (USPTO)